

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑫ 公表特許公報(A)

平5-503149

⑬ 公表 平成5年(1993)5月27日

⑭ Int. Cl.³
G 01 N 21/64
G 02 B 21/00

識別記号 庁内整理番号
Z 9115-2J
7246-2K

審査請求 未請求
予備審査請求 有

部門(区分) 6(1)

(全 14 頁)

⑮ 発明の名称 2光子レーザ走査顕微鏡

⑯ 特 願 平3-500520
⑰ 出 願 平2(1990)11月13日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)5月14日
⑲ 国際出願 PCT/US90/06482
⑳ 国際公開番号 WO91/07651
㉑ 国際公開日 平3(1991)5月30日

優先権主張 ㉒ 1989年11月14日 ㉓ 米国(U S) ㉔ 436,045

⑳ 発 明 者 デンク、ヴインフリート

スイス国 シーエイチ-8803 リュシユリコン、ザウマーシュトラ
ーセ 4番、アイビーエム フォルシュングスラボラトリウム

㉕ 出 願 人 コーネル・リサーチ・フアンデ
ーション・インコーポレイテツ
ド

アメリカ合衆国14850 ニューヨーク州イサカ、ソーンウッド・ドラ
イブ20番、スイート105

㉖ 代 理 人 弁理士 青山 葆 外1名

㉗ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FR
(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), S
E(広域特許)

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. 以下のものを含むレーザ走査顕微鏡

画像化されるべき目的物を受ける対象物面;

上記目的物は該目的物の蛍光特性を生成するため短波長スペクト

ラル領域の光による励起にตอบสนองする蛍光手段を含んでいる、

上記目標面に隣接して位置するレンズ手段;

長波長スペクトラル領域のサブピコ秒の単色コヒーレント光パル

ス源;

検出手段;

上記コヒーレント光を上記レンズ手段を含む光路に沿って上記目

的物に入射させるべく指向させるミラー手段;

上記長波長の光パルスは上記目的物内で蛍光を発生させるに十分
な瞬間的パワーを与え、該蛍光は上記光路上を伝播して上記検出手

段に至る出力光を与える。

2. 請求項1の顕微鏡において、上記光源は高い繰返率で高い瞬間
パワーのパルスを生じ、上記目的物は上記短波長の入射光によっ

て供給されたエネルギーに励起合って、少なくとも2つの長波長光
入射パルスからエネルギーを吸収するもの。

3. 請求項2の顕微鏡において、上記光源からの長波長光は上記レ
ンズ手段により上記目的物内にサブミクロンの直径にまで結焦され、
上記目的物内に蛍光を発生させるのに十分な高強度を生成するもの。

4. 請求項2の顕微鏡において、上記レンズ手段は上記目標面の対
向面に収束し発散する光を生じ、上記長波長光を円錐形状に
結焦し、それによって上記長波長光は上記目標面上の焦点に結焦さ
れるもの。

5. 請求項2の顕微鏡において、上記目的物は紫外線波長スペクト
ラル領域に単一の光子吸収ピークを有する蛍光発光団であり、赤色
波長スペクトラル領域において2個の光子を吸収 することができ
るもの。

6. 請求項5の顕微鏡において、上記レンズ手段は、上記目的物内
の焦点に上記長波長光を結焦し、該焦点の周囲の限定された楕円体
内に蛍光を励起する光強度を生じ、

7. 以下のものを含むレーザ走査顕微鏡、

所定の波長の光による一光子励起に対応する吸収ピークを有する目的物を受ける目標面；

上記目標面に隣接して位置するレンズ手段；

長波長のサブピコ秒の光パルスのレーザ光源；

該光は上記所定の波長の約2倍の波長を有する、

上記光パルスを上記目的物に入射させるべく、上記レンズ手段を含む光路に沿って上記光パルスを指向させるミラー手段；

上記レンズ手段は上記目的物内の焦点に上記光パルスを結焦し、上記光パルスの強度は上記単一光子吸収ピークに対応する単一光子励起エネルギーレベルに等価な2光子励起エネルギーレベルを上記焦点領域に生成する。

8. 請求項7の顕微鏡において、上記目的物は上記吸収ピークを有する蛍光発光団を含むもの。

9. 請求項8の顕微鏡において、上記蛍光発光団は蛍光を発生する所定の強度を与える入射光子に反応するもの。

な化学物質の局所的な放出を発生するために上記焦点における上記光パルスに反応するもの。

17. 請求項7の顕微鏡において、上記目的物は光子により活性化されうる試薬であるもの。

18. 請求項7の顕微鏡において、上記目的物は単一光源からの2光子エネルギーに反応する光メモリであるもの。

10. 請求項9の顕微鏡において、上記入射光パルスは光エネルギーを有する光子を上記目的物に与えるとともに、上記入射光の2光子の結合されたエネルギーが蛍光を発生させるために必要とされるもの。

11. 請求項10の顕微鏡において、上記レンズ手段は目的物内において異なる深さの焦点を選択しうようになっているもの。

12. 請求項11の顕微鏡において、目的物に関し、上記焦点を移動させるための走査手段をさらに含むもの。

13. 請求項12の顕微鏡において、上記目的物の蛍光を検出するための光路内の光に感応する検出手段をさらに含むもの。

14. 請求項13の顕微鏡において、上記検出手段は、上記蛍光に感応する光感知アレイであるもの。

15. 請求項7の顕微鏡において、上記目的物は上記光パルスによって上記焦点に生成される2光子励起エネルギーレベルに反応する生物細胞であるもの。

16. 請求項15の顕微鏡において、上記目的物は生物学的に活性

明 細 書

2光子レーザ走査顕微鏡

発明の背景

この発明は、国立保健機関によって与えられた認可番号P41R R04224、国立科学財団によって与えられた認可番号NSF-BBS-8714069およびNSF-DMB-8609084の政府援助によりなされたものである。政府は本発明においてある権利を有する。

フライイング・スポット・スキャナの原理は長い年月知られているにもかかわらず、その顕微鏡における応用は、必要な技術の開発に伴ってここ2、3年活発になされるようになっている。安定したレーザ光源および高速の電子画像認識・格納技術は、走査顕微鏡にとって必須の要素である。非共焦走査顕微鏡の画像化特性は、従来の顕微鏡のそれと極めてよく似ているにもかかわらず、新しい領域が共焦点走査顕微鏡によって拓かれた。この種の装置によって得られる分解能は徐々にしか向上していないが、それらによって得られ

る飛躍的に改良された深度分解能は、複雑な逆たたみ込み演算の必要なしに3次元画像の生成を可能にした。深度分解は、バックグラウンドを減少させ、このことは、ホトマルチプライヤ等の単一高精度検出器の使用と相俟って高い空間分解能を伴った定量的研究を可能とした。

共焦点走査顕微鏡の光軸に沿った分解能は、透明の目的物内において焦点面の上下において発生する背景散乱又は蛍光に対抗する有用な識別を可能とする。それは、また、一連の断面から3次元の蛍光画像を構築する場合や、定量的な蛍光インジケータ（指示薬）の使用或は非平面表面のセル表面受容体の蛍光マーカのマップ化にとって極めて有用である。この種の装置は僅かに良好な横方向分解能、極めて優れた深度視野分解能および従来の装置で理想的な条件下で得られるよりも倍率のオーダがより優れた理想的条件下でのバックグラウンド識別を与える。

走査は、静止ビームに対して試料ステージを移動させるか、照明と蛍光応答信号の両方を高精度に同期させて光学走査のいずれかに

レーザによって照明される単一点が移動する目的物を横切って走査される共焦点走査顕微鏡は低走査速度において極めて良好に動作し、可視光を吸収・射出する蛍光マーカを用いて優秀なレーザ走査顕微鏡が得られている。しかしながら、スペクトラムの紫外線部分によって励起される蛍光光団及び蛍光化学指示薬を有する共焦点走査画像は、色収差が補正されなければならない適当な顕微鏡用レンズがないために、そのうえ、紫外光によって生きている細胞に対して加えられるダメージのゆえに、実用に供されていない。さらに、紫外線レーザの諸種の制限が、上記の用途を困難なものとしている。蛍光顕微鏡法は、明白なことであるが、目的物内の蛍光光団の光漂白によってさらに制限される。なぜならば、励起光は、蛍光体を励起しながら、蛍光光団を徐々に光漂白するからである。レーザ走査共焦点蛍光顕微鏡法においてさえ、結焦された励起光は焦点面を走査するに従って、ある時間平均では、目的試料の全体の深さ亙って均一に照射するため、広視野顕微鏡において生ずるのと本質的に同様の光漂白

によって行われる。ステージの移動方式が光学的観点からは好ましいが、サンプルの受入れおよび装填、収納容器の使用および微細電極を用いた電氣的記録に関する制限をもたらす。したがって、スポット移動方式が多くの場合好ましい。このような移動スポットは、ガルバノメータ・スキャナに装着したミラーの使用によって生成されるが、これは得ることができるフレーム周波数を制限する。音響光学デフレクタの使用は、その強い散散のゆえに蛍光顕微鏡における共焦点空間フィルタとの干渉を惹起する。多角形ミラーはガルバノメータ・スキャナより高速であるが、それ単独では、操作のベクトルモードが不可能である。

従来のアーク光源は、回転ディスク照明器を利用する共焦点走査顕微鏡の種々の応用に用いることができるが、明らかに不可避な強度変動によって定量的な応用のための使用は制限される。かかる装置において、画像は、ディスクの共焦ピンホールの2者一体のセットを通して、或いは、最近の形式では、照明ピンホールそれ自身を通して形成される。

が惹起される。光漂白は、多数の2次元画像が必要とされ、各2次元画像の検出が試料全体の光漂白をもたらすために、3次元画像の再構成においてとりわけ問題となる。

発明の概要

上記の各種の困難は、本発明によれば、レーザ走査顕微鏡法において蛍光体の2光子分子励起の使用によって克服される。本発明によれば、2光子励起は、(a)直径で1ミクロン以下の散乱が制限されたくびれ状にレーザが結像されるレーザ走査顕微鏡において可能な強力な結像作用によって与えられる極めて高く局所的でかつ瞬間的な強度と、(b)パルス化されたレーザの一時的な集中の組合によって可能となる。コライディング・パルス、モード・ロック型ダイレーザ(dye laser)のように、回折限界まで結像可能な高強度、長波長、単色光源は、各パルスが約80MHzの繰り返し率で約100フェムト秒(100×10^{-15} 秒)の期間を有するパルスの流れを生成する。これらのサブピコ秒のパルスは、例えば2色ミラーによって、顕微鏡に供給され、顕微鏡の対象面に位置

する試料もしくは目的物に指向される。回折限界まで結像されたごく短時間の強力なパルスによって与えられる瞬間的な高いパワーのゆえに、目的物に含有され通常は典型的には紫外線等の短い波長の高エネルギー単一光子によって励起される蛍光光団（蛍光染料）がレーザー光源からの2つの長波長の光子を同時に吸収する相当の確率が存在する。この吸収は、蛍光体分子内において2つの光子のエネルギーを結合し、それによって、蛍光体をその励起状態に移させる。蛍光体が正規状態に戻ると、それは光を放出し、この光は顕微鏡の光学系を逆方向に通過して適当な検出器に至る。

高強度短時間の光パルスによる蛍光体の2光子励起は、バックグラウンド判別の改善、蛍光体の光漂白の減少を可能にし、かつ生きている細胞試料に対する光によるダメージを最小化する顕微鏡のための一般的な蛍光技術を構成する。これは、顕微鏡内において生成され結像化された照明は、試料内を通過する原収束円錐をなすからである。収束円錐の頂点において焦点面に達する光の全ては、蛍光体に吸収される僅かな部分を除いて、発散円錐となって試料の対向

のに匹敵する視野分解能の深度が得られる。このことは、より厚い細胞層が研究されるべき場所にはとりわけ重要である、さらに、2光子励起は、背景蛍光を大幅に減少させる。

上で議論した2光子吸収技術は、デミトリ エイ・パーセンノボロス等 (Dimitri A. Parthenopoulos et al.) の“3次元光学格納メモリ” (Three-dimensional Optical Storage Memory) と題する論文; サイエンス (Science)、Vol. 245、pages 843-845、August 25、1989; に記述された型式の3次元光学メモリ装置において選択された場所を励起するためにも使用可能である。本発明によれば、単一レーザー光源又は共軸多重光源からの比較的長い波長光の極めて短いが高強度のパルスが、走査顕微鏡を通して、高分子組織内に埋込まれた結晶、組成物もしくは発光団の如き、ホトクロミック或いは光分解可能な (photolyzable) 蛍光物質である格納媒体内に指向される。入射光ビームは組織内の多くの層のいずれか一つの上

面側に出ていく。収束する円錐と発散する円錐とによって形成されるくびれにおける対象面上の焦点領域内においてのみ、強度は試料中の蛍光体内への2光子吸収を生成するに十分なものとなり、この強度依存性（分布）は、長い波長の光をして、試料の焦点の廻りのごく局所的な体積内においてのみ短波長による励起と同等の効果をもたらす。この吸収は試料の焦点領域外の部分の全体にわたって長波長光の軟らかな平均照明光強度を保持する比較的長波長の高速、高強度のフェムト秒のパルス手段によって達成される。その結果、焦点面外の蛍光体の光漂白は殆どなくなる。長波長光の1光子吸収は無視でき、焦点面外では、時間平均の照明が試料の全深さに亘って実際上はほぼ均一であったとしても、瞬間的な強度は相当の2光子吸収・励起をもたらすには、あまりに低すぎる。この効果は、さらに、生きている細胞へのダメージを大幅に減少させる。

本発明の2光子吸収は正確な空間的認識を可能とし、3次元的に位置が定められた小さな体積から、蛍光の量子化を可能とし、したがって、前述した如き共焦点レーザー走査顕微鏡において得られるも

に高度に結像され、かつその強度は、選択された層を横切って走査されるか或いは歩進されるかにしたがって変調される。ビームはビームによって表現されるコード化された情報が媒体内において2値の形式で格納されるように、組織内において選択された場所を励起する。高度に結像されたビームは、正確な格納に必要な空間的分解能を与える。フェムト秒の高強度パルスは、通常は紫外線領域の光による励起を必要とする物質内に情報を書き込むために組織物質内による2光子吸収を惹起させる。組織内の書き込まれた点の励起レベルは上記した分子内において蛍光を生成する長波長の読取りレーザーによって検出もしくは読取られる。

図面の簡単な説明

本発明の上記およびさらに別の目的、特徴および利点は、添付の図面を参照した実施例の以下の詳細な説明から明らかになるであろう：

第1図は本発明にしたがって実用化されたレーザー走査共焦点顕微鏡の図式的な図である：

第1A図は第1図の装置の目標面領域の拡大部分図である；

第2図は赤色光の2光子吸収によって励起された青色の蛍光を示す合成ステレオ画像対である；

第3図は蛍光ラテックスビードの内側の面領域からの平均強度対印加された平均レーザーパワーの比を示すグラフである；

第4図はDNA色素で着色された豚の培養腎細胞の染色体の2光子励起蛍光画像である；

第5図は焦点面に限って2光子光漂白を示すラテックスビードの画像である；

第6図は蛍光的に着色されたラテックスビードの内側の2光子光漂白されたパターンの画像である。

実施例の記述

第1図に示された本発明のより詳細な記述を以下に行う。第1図には図式的な形で従来のレーザー走査顕微鏡10が示されており、レーザーなどの光源16から対物面18に入射する入射光14を結像するための対物レンズ12を備えている。第1A図に図示される如く

に走査することが好ましい。

レーザー16から目標面18に至る光路はレーザー16からの光が指向される2色ミラー28を含む。以下により詳細に説明するように、本発明によればレーザーからの出力は比較的長い波長、好ましくは可視の赤もしくは赤外に近いスペクトラル領域の光の短い高強度のパルスからなる。ミラー28はこの長波長の光をミラー30に向けて下向きに偏向させ、ミラー30は湾曲ミラー36および38を介して上記光を走査ミラー32および34の対に指向させる。ミラー32および34は互いに垂直な軸の回りで回転可能であり、目標面上のXおよびY軸に沿って入射光14を移動させ、それによって静止した資料は走査される。走査ミラーからの光はアイピース40を通して対物レンズ12を通して目標面18に結像される。

第1A図において点線の矢印42で示した資料20内で発生された蛍光は顕微鏡を通して逆方向に伝達し、入射ビーム14の光路を逆方向に進み、したがって対物レンズ12、アイピース40、走査ミラー34および32、湾曲ミラー38および36を経由してミラ

対物面は移動可能なステージ22によって搬送されうる試料もしくはは目的物20の上または内部に位置しうる。入射光ビームによる照明光は24で示す収束円錐を満たし、該円錐は試料20の内部を通して目標面18の焦点面に達し、さらに目標面上の試料によって吸収されるごく一部の光を除いて発散する円錐25を通して外部に通過する。入射光は目標面18上においてくびれ即ち焦点26を形成する。焦点26の直径は光路内の回折によって制限されるが、好ましくは1ミクロン以下である。よく知られているように顕微鏡光学系の調整によって試料20内の焦点の垂直位置は選択することができる。さらにステージ22は水平面内において試料の選択された箇所に入射光を位置させるべくXおよびY軸に沿ったラスタースキャンのような方法で水平面内において移動可能であり、したがって全体として試料の3次元的な走査が得られる。しかしながら、機械的に走査されるステージは種々の困難をもたらすので、静止ステージを用いることが好ましく、例えば顕微鏡の光路内に配置した走査ミラーのごとき手段によって入射ビームをX-Y面内において光学的

に走査することが好ましい。資料内の蛍光物質によって射出された光は資料内に含まれた蛍光物質に固有の波長であり、したがって入射光14の波長とは異なっている。この蛍光はレーザー16方向に反射されることなしに、2色ミラー28を通過することができ、したがって44で示す光路を進む。このようにして蛍光42はバリアフィルタ46を通過し、平面ミラー48、50および52によって光増倍管54のごとき適当な検出器に向けて反射される。本発明によれば共焦レーザー走査顕微鏡が選択され、したがってそのような顕微鏡が図面に図示されている。しかしながら、他の形式のレーザー走査顕微鏡も使用可能であることは理解されるであろう。共焦顕微鏡10内においては調節可能な共焦ピンホール56が集光光学系44内に備えられており、結像面の上と下に位置する収束および発散円錐24および25内において励起される背景蛍光を最小化する。この共焦ピンホールは有用であるが、本発明による2光子蛍光励起においては励起が対物面の焦点26の領域に本質的に限られるので必要ではない。従来の蛍光顕微鏡では可視光である蛍光光子

42は、励起状態から分子の弛緩の間に生成される蛍光42より高いエネルギー、すなわちより短い波長を有する入射光14の単一光子を吸収することによって励起される分子によって生成される。このような従来の装置においては、1分子あたりに放出される蛍光光子の数は吸収された励起光子の数に通常線形的に比例する。そのような従来の装置では単一の光子のみが吸収される必要があるので、励起光14を吸収する分子の光分解 (photolysis) は、このプロセスは必ずしも強度に比例するものではないが、試料20内の二重の円錐ビーム24および25に沿ったすべての領域で起こる。二重の円錐ビームのすべてで蛍光が発生されるため、励起光14の焦点面の内部、上側および下側の試料内の各面から放出される蛍光の量は、ほぼ各部分において同じとなり、したがって3次元的な分解能を得るのは困難である。その結果試料全体を通して入射光の高いエネルギーは試料にダメージを与え、このことはとりわけ生きた細胞を観察する場合には好ましいことではない。

走査顕微鏡において3次元的な分解能を得るとともに、顕微鏡の

明によれば長い波長の励起光のみが試料内を通過し、かつこの長い波長の光はごく小さな領域においてのみ蛍光を励起するに足る強度を与えるように結像される。この蛍光は蛍光体が通常、紫外線領域のみを吸収するような場合においても生成される。焦点は試料内において選択的に位置決めすることができるので、3次元的な分解能は走査蛍光顕微鏡法および光分解によって放出されうる光子活性化可能な試薬の光分解法の両方において得ることができる。

本発明によれば必要な励起強度は例えば約630nmの赤色領域の波長を有し、約80MHzの繰返率で100fs以下幅の光パルスが発生する例えばコライディング・パルス・モード・ロック・ダイレーザ等の光源16から顕微鏡の焦点に与えられる。他の輝度の高いパルス化レーザも赤外もしくは可視赤色領域における比較的長い波長の光を発生させるために用いることができ、それによって入射光の波長の約1/2の波長を有する単一光子の吸収によって通常は励起されるような試料内の蛍光体によって要求されるような適当な吸収エネルギーまで足し合わされるような必要な励起光子エ

焦点外の領域において試料に与えるダメージを減少させるため、本発明は励起光の波長の1/2だけオーバーラップする波長に1光子吸収のピークを有する蛍光体の2光子励起を利用する。これを実現するため、レーザ16はたとえば可視の赤色もしくは赤外領域等の比較的長い波長を有する高い瞬間パワーのごく短いレーザビームパルスを生じする。この光は例えば紫外線等の短い波長の領域の単一光子によって通常励起される蛍光体を含む試料に向けて指向され、2つの低いエネルギー (赤色) の光子は、単一の高いエネルギー (紫外) の光子によって与えられると同じの試料の励起を発生するためには互いのエネルギーを結合する必要がある。励起およびしたがって試料の蛍光率の両方は入射光の強度の2乗に比例する。結像された励起レーザビーム14では長波長の入射光の強度は顕微鏡光学系の焦点面26の領域においてのみ試料内の蛍光体を励起するに足る強度を有するものとなる。この焦点面は試料内において調節可能に位置決めすることができ、試料の蛍光および光分解は焦点の回りの選択された棒状の体積においてのみ発生される。したがって本発

明によれば長い波長の励起光のみが試料内を通過し、かつこの長い波長の光はごく小さな領域においてのみ蛍光を励起するに足る強度を与えるように結像される。この蛍光は蛍光体が通常、紫外線領域のみを吸収するような場合においても生成される。焦点は試料内において選択的に位置決めすることができるので、3次元的な分解能は走査蛍光顕微鏡法および光分解によって放出されうる光子活性化可能な試薬の光分解法の両方において得ることができる。

本発明の変形例では単一波長の光源16が2つの異なる長い波長のレーザ光源によって置き換えられ、入射光ビーム14は高い瞬間パワーを有し、かつ波長の異なる2つの重畳されたパルス光ビームからなる。入射ビームの各波長は短い波長での吸収体である蛍光体を励起するべく選択され、それは以下のように表される。

$$1/\lambda_{\text{...}} = 1/\lambda_1 + 1/\lambda_2$$

$\lambda_{\text{...}}$ は吸収体の短い波長であり、 λ_1 , λ_2 は入射レーザビームの波長である。

2光子励起においては典型的な2光子断面積 δ :

$$\delta = 10^{-18} \text{ m}^2 \text{ s} / \text{光子} \quad \dots \text{ (式1)}$$

上記のパルスパラメータ (100fs, 反復率80MHz):

さらに開口数 $A = 1.4$ のレンズによって結像されたビーム:

約50mWの平均入射レーザーパワー (P_0) の条件で各パルスあたり、各蛍光体あたり1つの光子が吸収される制限において蛍光体の蛍光体出力が飽和する。蛍光体あたり、パルスあたりに吸収される光子の数 n は以下の関係式によって与えられる。

$$n \approx \frac{P_0 \delta}{\tau f^2} \left[\frac{A^2}{2 \pi c \lambda} \right]^2 \quad \dots (式2)$$

ここで τ はパルス幅； f は反復率； P_0 は平均入射レーザーパワー； δ は光子吸収断面積； π はプランク常数； c は光の速度； A は結像レンズの開口数。

蛍光放射はパルス繰返周波数を典型的には以下の式で表される蛍光の寿命の逆数まで増大することによって増大される。

$$\tau_{eff}^{-1} = 10^3 S^{-1} \quad \dots (式3)$$

比較のため1光子蛍光の飽和は約3mWの入射パワーで生ずる。

第2図は本発明に係る2光子技術によって達成された深度判別を示す。画像60および62のステレオ対が通常は約365nmの波長を有する紫外線によって励起される9マイクロメートルの直径の

の2光子励起の発生を示している。ポリサイエンシズ・コーポレーション製のフルオレスブライトBBビードを用いたビードの励起断面積がビード内の染料濃度、レーザー走査顕微鏡の光学的スループット、パルス幅、反復率、開口数および入射パワー等を考慮して、ファクタ3の範囲の精度で $5 \times 10^{-11} M^2 s / \text{光子}$ であると推定された。この値は同様の染料に対して以前に測定された値に匹敵するものである。

第4図は分割された細胞 (LLC-PK1: at t c) 内の染色体の走査画像であり、紫外線で励起可能な蛍光染料 (33258: ヘキスト) でラベル付けされたセラーDNAを用いた。画像認識時間は13秒で、これは数分の漂白時間に比して短いものである。さらに数分の間走査レーザーによって照射した後においても、これら生きた細胞内には何らの劣化も現れなかった。

第5図にビード72の光漂白による輝度の減少された水平断面70によって示されるように長時間の蛍光ビードの走査の間の光漂白は焦点面の回りの約2マイクロメートルの厚みの薄片においてのみ

ラテックスビードの蛍光体のクラスターの画像の積み重ねから発生されたこれらの画像は標準的なレーザー走査顕微鏡を用いて得られたが、連続波アルゴンイオンレーザー照明器16を約630nmの波長で出力パルスを生成する25mWのコライディング・パルス・モード・ロック・ダイレーザによって置き換えた。顕微鏡10について行われた測定の結果、目標面では約3mWに達したことを示していた。380~445nmの波長を通過させる射出フィルタがバリアフィルタ46に設けられるとともに、検出器開口54が小さな共焦点開口に起因する光学的しきり効果を減少させるために、その境界に開口された。

レーザー16からの入射ビーム14の強度はレーザー16と2色ミラー26との間において励起ビーム中に中性濃度フィルタを置くことによって調整され、個々のラテックスビードによって生成される青色蛍光が特定された。第3図にグラフ64で示されるように試料を合成するラテックスビードからの蛍光の検出強度は励起レーザーパワーの2乗に比例して増大しており、このことは明らかにビード内で

発生している。このビードは一定の焦点面において約6分間走査されたものである。同様の漂白の局所化は蛍光で染色された細胞核においても検出された。この局所化は単一光子励起の使用に対して明らかな利点を示しており、単一光子励起では一つの面が画像化される場合においてさえ、試料全体が漂白されてしまう。このことは単一光子励起ゆえであって、走査を広い視野の観察の両方における漂白は時間平均の励起強度に依存し、その強度は軸方向すなわち第1図のZ方向に沿って変化しない。2光子励起においては漂白は焦点面上側もしくは下側においては大きく低下する時間平均強度に依存する。

励起強度の2乗に依存する蛍光信号は2光子励起のいま一つの利点に対応するものであって、このような励起は空間フィルタとして使用されるピンホールを用いる必要なしに全視野を視覚する、例えばCCDアレイのような検出器を用いた場合にさえ試料の光学的な遮断効果をもたらす。第5図に図示されているように、この遮断効果は対物レンズにおける色収差や従来の共焦点レーザー走査顕微鏡のス

ループ損失に関連する深刻な問題を回避することができる。2光子光分解はかご閉じ込みされた Ca^{++} 、 H^+ 、ヌクレオチドや神経伝達媒体などの生物学的に活性な化学物質の高速かつ局所的な放出にも適用することができる。

例えばかご閉じ込み(caged)神経伝達物質が、走査ビームによって放出されたときに、発生された全細胞転移膜電流は、細胞表面上のそれら神経伝達物質に対する受容体活動の分布をマップ化するためのコントラスト発生機構として使用することができる。本発明によれば、2光子かご閉じ込み光分解の実現可能性が、DMNPEでかご閉じ込みATP(33mM)【オレゴン・オイジーンのモレキュラープローブ(Molecular Probes)によって提供される】を照射することによって、対物面において約10マイクロメートルの直径のくびれのビームに結像されるコライディング・パルス・モード・ロック・ダイレーザ16によって証明された。ATP約 10^{-11} モルの光分解量が、カリホルニヤ、サンジエゴのカルバイオケム(Calbiochem)によって提供されるルシフェ

溶液から、直径25mのくびれに弱く結像させたCMPを用いた励起に原して可視蛍光が観察され、DANSYLとCoumarin 440の微結晶の2光子励起LSM蛍光画像が記録された。

本発明のいま一つの効用は書き込みおよび読取り動作のための二つの横断ビームにおける多光子プロセスに依存する3次元の光学メモリ装置である。単一ビームは二つの横断ビームより簡単であり、最大の情報掘り込み密度を可能にするであろう。多光子プロセスは焦点において極めて高い強度の領域に局所化され、第5図に示す例では蛍光ビードの内側の顕微鏡パターンの深白は現行の蛍光体で約 10^8 回読取り可能な高密度書き込み専用メモリを構成する。

以上のように生物学的な或は他の応用のための実用的な2光子レーザ走査顕微鏡が図示されて、かつ説明された。2光子励起の蛍光顕微鏡は共焦点レーザ走査顕微鏡によって得られるものと匹敵するような視野深度を有する固有の3次元的な分解能を与える。2光子励起との関係で共焦点ピンホールを用いると、3軸すべてに沿って分解能を改善することができる。背景蛍光は異なった入力パワーの

リンバイオルミネッセンス検定を用いて測定された。典型的には、約 10^7 (μm)³のアリコート体積内のATPの約10%が約600秒の間に、約 10^4 (μm)³の照射体積内において光分解された。

本発明による2光子励起は、単一紫外線光子の励起に対応する励起エネルギーへの可視光によるアクセスをあたえるので、全く新しいクラスの蛍光体や蛍光指示薬が3次元分解能を有するレーザ走査顕微鏡に受入れ可能となった。この種の指示薬として、 Ca^{++} に対してはIndo-1、 Mg^{++} に対してはMg-Indo-1、 Na^+ に対してはABF1、 K^+ に対してはPBFI等がある。これら化合物の多くについて2光子吸収断面積は未だ知られていないが、2光子吸収には異なる選択則が適用され、分子の不変は同じ励起状態への1光子および2光子遷移の両方を可能にする。Indo-1、FURA-2、Hoechst 33258、Hoechst 33342、DANSYLヒドラジン[Molecular Probe]、Stilbene 420[Exciton Chem. Co., Dayton, OH]および複雑のクマリン染料の10mMの

下で記録された画像の定量化された減算によって取り除くことができる。この技術を用いると光源白ならびに光学的なダメージは焦点面の近傍に限定することができ、それによって、細胞や蛍光体に対する紫外線によるダメージが情報が実際に集められる体積に限定されることから、3次元的な再構成のためのデータの認識のための共焦点レーザ走査顕微鏡法および領域検出画像化いづれに対しても相当な利点を与えることができる。このことは光分解や光活性化などの光化学プロセスを結像体積内に鋭く局所化することを可能にする。本発明は主として単一レーザを用いた2光子励起の利用について説明したが、足し合わすことによって目的物質の励起波長になる二つの異なる波長を有する二つの光源からの二つの光子を用いることによって目的物質の励起を発生することができる。例えば二つの異なるレーザ光源はそれらの出力ビームを顕微鏡の光路に共軸的に指向させることによって用いることができる。さらには局波数の2倍化手段を用いて二つの異なる波長を単一の光源から発生することもできる。

以上のように本発明は好ましい実施例との関係で記述したが、添付の請求の範囲において規定された本発明の技術思想と範囲を逸脱することなく、種々の変形や修正が当業者にとって可能である。

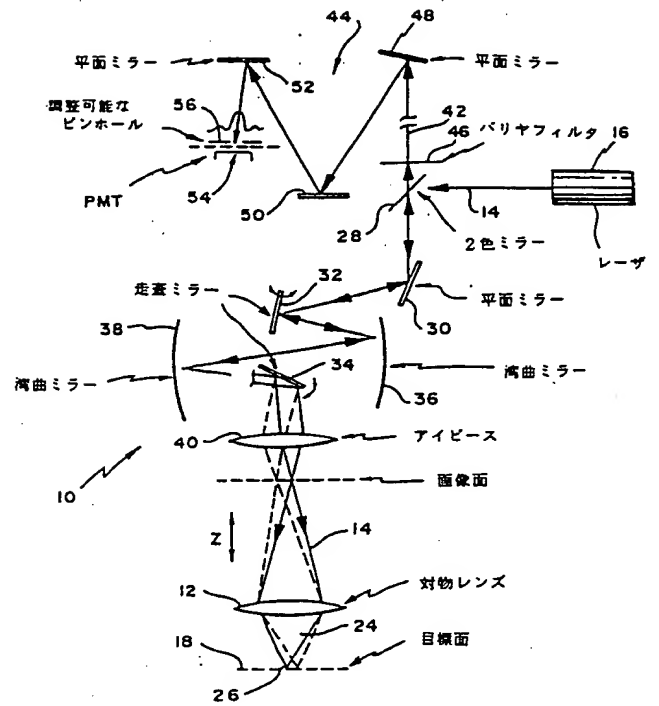


FIG. 1

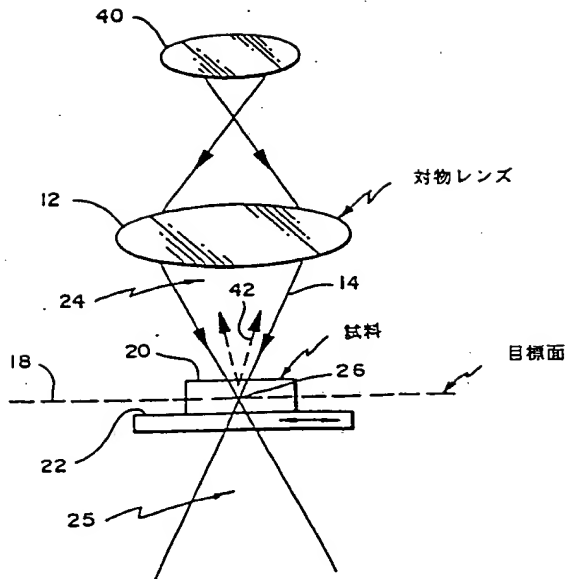


FIG. 1A

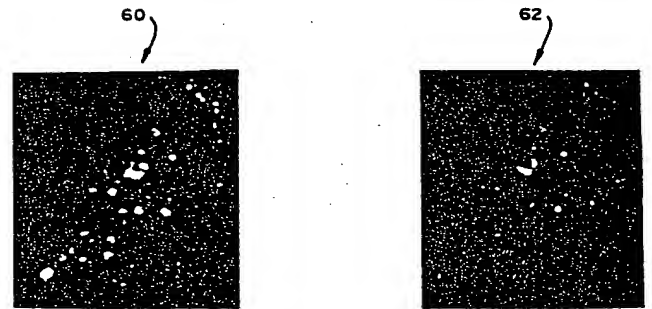


FIG. 2

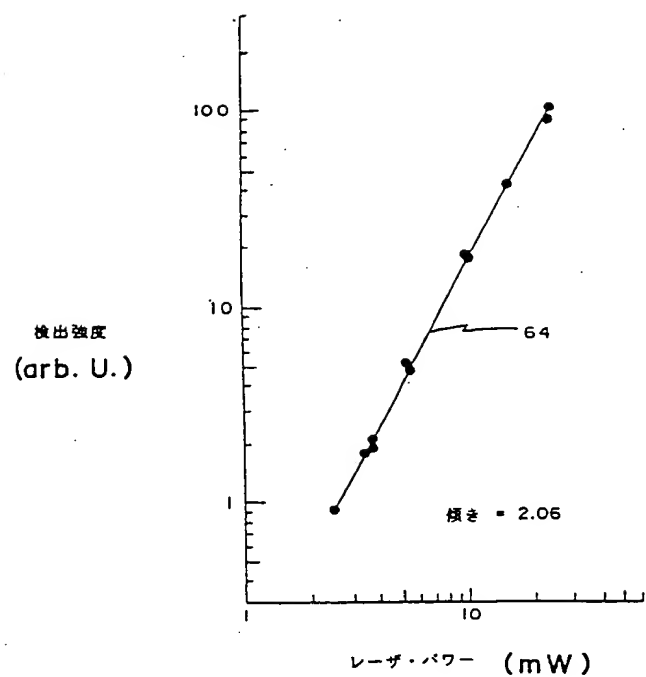


FIG. 3



FIG. 4

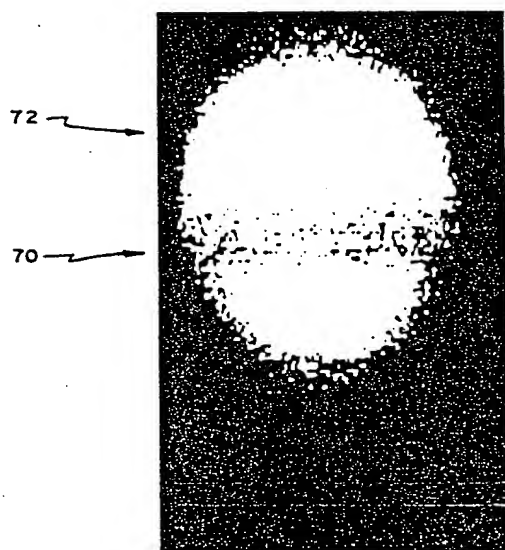


FIG. 5

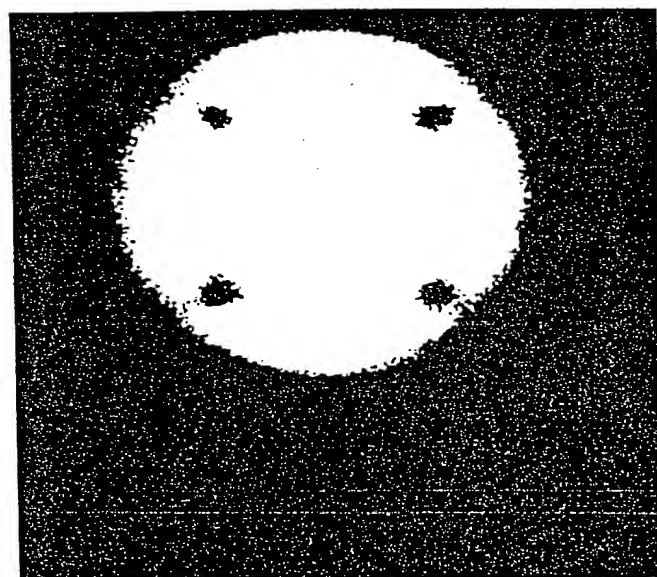


FIG. 6

平成4年 5月 14日 通

特許庁長官殿

1. 特許出願の表示

PCT/US90/06482

2. 発明の名称

2光子レーザ走査顕微鏡

3. 特許出願人

名称 コーネル・リサーチ・ファンデーション・インコーポレイテッド

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号

ツイン21 MIDタワー内 電話 (06)949-1261

氏名 弁理士 (6214) 青 山 稔



5. 補正書の提出年月日

1991年 11月 25日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文

1 通



請求の範囲

1. 以下のものを含むレーザ走査顕微鏡：

画像化されるべき目的物を受けるステージ手段；

上記目的物は特性蛍光を発生すべく短波長スペクトラル領域における光子による励起にตอบสนองする蛍光手段を含んでいる、

上記ステージ手段に光を指向させるべく位置決めされ、ステージ手段において目的物内に目標面を有するレンズ手段；

上記ステージ手段における目的物とその特性蛍光を発生させるために単一の光子励起によっては応答しない長波長スペクトラル領域内の光子からなる高い瞬間エネルギー強度のサブピコ秒の単色コヒーレント光パルスの光源；

上記パルスは高い繰返率を有する、

検出手段；

上記ステージ手段における目的物に入射させるべく上記コヒーレント光パルスを上記レンズ手段を含む光路に沿って指向させる手段

：

特表平5-503149 (11)

溶液から、直径25μmのくびれに弱く結像させたCMPを用いた

励起に際して可視蛍光が観察され、DANSYLとCoumarin 440の微結晶の2光子励起LSM蛍光画像が記録された。

本発明のいま一つの効用は害込みおよび脱取り動作のための二つの横断ビームにおける多光子プロセスに依存する3次元の光学メモリ装置である。単一ビームは二つの横断ビームより簡単であり、最大の情報収まり密度を可能にするであろう。多光子プロセスは焦点において極めて高い強度の領域に局所化され、第5図に示す例では蛍光ビードの内側の顕微鏡パターンの漂白は現行の蛍光体で約10³回脱取り可能な高密度害込み専用メモリを構成する。

以上のように生物学的な或は他の応用のための実用的な2光子レーザ走査顕微鏡が図示されて、かつ説明された。2光子励起の蛍光顕微鏡は共焦点レーザ走査顕微鏡によって得られるものと匹敵するような視野深度を有する固有の3次元的な分解能を与える。2光子励起との関係で共焦点ピンホールを用いると、3軸すべてに沿って分解能を改善することができる。背景蛍光は異なった入力パワーの

上記レンズ手段は、上記長波長光パルスが上記目標面において目的物内に2つの入射光子の同時の吸収を発生させるのに十分な瞬間的強度を与え、それによって上記ステージ手段における目的物内に特性蛍光を励起させるように上記目標面上に上記光パルスを結像させ、上記蛍光は上記光路上を伝播して検出手段に至る出力光を与える。

2. 請求項1の顕微鏡において、上記光源は、上記ステージ手段における目的物が上記目標面においてのみ少なくとも二つの長波長の入射光子から同時にエネルギーを吸収するように十分な瞬間的強度と繰返率を有するサブピコ秒のパルスを発生するもの。

3. 請求項1の顕微鏡において、上記レンズ手段は目標面において上記光源からの長波長光を結像させるように上記ステージ手段に関して位置決めされており、上記ステージ手段のターゲット内において蛍光を発生させるため、上記対物面においては十分に高い強度を与え、蛍光を発生させるための上記焦点面の外側では不十分な強度を発生させるようにしたもの。

4. 請求項1の顕微鏡において、上記レンズ手段は上記目標面の対

抗する側において収束および発散する光を発生するように上記長波長の光を円錐形状に結像するように配置されており、それによって長波長光は上記目標面上の焦点に集中されるもの。

5. 請求項1の顕微鏡において、上記ステージ手段によって支持される目的物をさらに含み、上記光源からの上記長波長光は赤色波長領域にあり、かつ上記レンズ手段は上記ステージ手段における目的物内の焦点に上記光を結像し、上記目的物は紫外線波長領域において単一光子吸収ピークを有するとともに赤色波長領域において二つの光子を吸収して蛍光を発生する蛍光体であるもの。

6. 請求項5の顕微鏡において、上記レンズ手段は上記目的物内の焦点に長波長光を結像するように配置されており、上記焦点の周りの限られた楕円体状の体積において蛍光を励起する光強度を生成するもの。

7. 以下のものを含むレーザ走査顕微鏡：

所定の波長の光による単一光子励起に対応する吸収エネルギーレベルピークを有する目的物を受容するステージ手段；

ステージ手段における目的物に対して赤色波長スペクトラル領域の光エネルギーを有する光子を与え、かつ上記入射光の二つの光子の結合エネルギーはその内部に蛍光を発生するために必要な値であるもの。

10. 請求項9の顕微鏡において、上記レンズ手段は上記ステージ手段における上記目的物内において上記焦点を異なる深さに選択できるように調整可能であるもの。

11. 請求項10の顕微鏡において、上記ステージ手段における上記目的物に関して上記焦点を移動させるための走査手段をさらに含むもの。

12. 請求項11の顕微鏡において、上記ステージ手段における目的物によって生成される蛍光を検出するため、上記光路内における光に感応する検出手段をさらに含むもの。

13. 請求項12の顕微鏡において、上記検出手段は上記蛍光に感応する光感知アレイであるもの。

14. 請求項7の顕微鏡において、上記ステージ手段における目的物をさらに含み、該目的物は上記光パルスにより、上記焦点に生成

上記ステージ手段に光を指向させるように配置されており、上記

ステージ手段における目的物内に目標面を有するレンズ手段；

サブピコ秒のレーザ光パルスのレーザ光源；

上記レーザ光は上記所定の波長の約2倍の波長を有する、

上記レーザ光パルスを上記目標面における目的物に上記パルスを入射させるために上記レンズ手段を含む光路に沿って指向させるミラー手段；

上記レンズ手段は目的物内の焦点に上記レーザ光パルスを結像させ、上記パルスの強度は、上記単一光子吸収ピークに対応する単一光子励起エネルギーレベルに等しい2光子励起エネルギーを上記焦点領域に生成する。

8. 請求項7の顕微鏡において、上記長波長光は赤色波長スペクトラル領域内にあり、上記レンズ手段は、上記ステージ手段における目的物内の焦点に上記光を結像させ、上記目的物は上記吸収ピークを有する蛍光体を含有するもの。

9. 請求項7の顕微鏡において、上記長波長の光パルスは上記ステータされた2光子励起エネルギーレベルに感応する生物細胞であるもの。

15. 請求項14の顕微鏡において、上記ステージ手段における上記目的物は上記焦点における光パルスに反応して生物学的に活性化化学物質の局所的な放出を発生する手段を含むもの。

16. 請求項7の顕微鏡において、目的物をさらにふくんでおり、上記目的物は光子によって活性化されうる試薬であるもの。

17. 2光子励起技術による蛍光顕微鏡方法であって、以下の工程を含むもの：

第1の特性エネルギーを有する光子を輻射する蛍光分子を含む試料を用意すること；

第2の特性エネルギーを有する光子を含む高速で繰り返される高い強度のサブピコ秒のレーザ光パルスのビームで上記試料を照射すること；

上記第2の特性エネルギーは上記第1の特性エネルギーの約1/2である、

上記照射光を上記試料内においてサブミクロンの直径を有する焦

点に結像させ、上記焦点における照射強度を二つの入射光子の同時吸収によって上記試料の分子励起および蛍光を発生させるに十分な強度とすること；

上記試料内で上記ビームのサブミクロンの直径の焦点をラスタパターンにしたがって走査すること；および上記試料によって発生された蛍光を検出すること。

18. 請求項17の方法において、上記照射工程は上記焦点においてのみ分子励起を生成し、それによって背景蛍光を抑制することができるのに十分な照明強度を有する光ビームの方向付を含むもの。

19. 請求項17の方法において、上記照射工程は上記焦点においてのみ分子励起を生成し、それによって焦点の外側に位置する試料の光漂白を抑制することができるのに十分な照明強度を有する光ビームの方向付けを含むもの。

20. 請求項17の方法において、試料を用意する工程が生きている生物試料を用意することを含むもの。

21. 2光子励起技術によるかご捕捉された生物学的に活性な化合物

物の局所的な光分解放出を発生させるための方法であって、以下の工程を含むもの；

第1の特性エネルギーを有する光子によって励起されうるかご捕捉された生物学的に活性な分子を含む試料を用意すること；

第2の特性エネルギーを有する光子を含む高速で繰り返される高い強度のサブピコ秒のレーザー光パルスのビームで上記試料を照射すること；

上記第2の特性エネルギーは上記第1の特性エネルギーの約1/2である、

上記照射光を上記試料内においてサブミクロンの直径を有する焦点に結像させ、上記焦点における照射強度を二つの入射光子の同時吸収によって上記試料の分子励起およびかご捕捉された生物学的に活性な化合物の放出を発生させるに十分な強度とすること。

国際調査報告

International Search Report PCT/US 90/06482

1. CLASSIFICATION		A. SURVEY MATTER IN GENERAL DISCLOSURE SYMBOLS FROM, INCLUDING, ARE:	
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		Int. Cl. ³ G 01 N 21/64.....U.S. Cl. 250/458.1	
B. FIELDS SEARCHED			
Classification System		Classification System	
U.S.	250/458.1, 461.1, 462.1, 423, 356/318, 365/106, 127		
Documentation Searched other than Maximum Documentation			
to the extent that such Documentation was included in the Fields Searched			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**			
Category *	Character of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant passages **	Relevant to Claim No. **	
X	US, A. 4,877,965 (Dandliker et al.) 31 October 1989 (31.10.89). See full document.	1	
Y	US, A. 4,827,125 (Goldstein) 02 May 1989 (02.05.89). See column 2, lines 30-45.	1,7	
Y	US, A. 4,631,581 (Carlsson) 23 December 1986 (23.12.86). See full document.	1,7	
Y	Journal of Physics E:Scientific Instruments, vol. 8, 1975, Great Britain, Fritzier et al., "A spectrometer for semiautomatic two photon fluorescence spectroscopy", pp.530-532. See Abstract and Introduction.	1,7	
Y	Journal of the Association for the Advancement of Medical Instrumentation, vol. 6, No. 3, 1972, Williams & Wilkins Company, Slombs et al., "A laser flying spot scanner for use in automated fluorescent antibody instrumentation", pp.230-234. See full document.	1,7	
* Symbolic classification of other documents: **			
"A" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"X" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"Y" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"Y" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"Z" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"Z" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"W" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"W" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"U" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"U" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"T" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"T" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"S" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"S" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"R" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"R" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"Q" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"Q" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"P" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"P" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"O" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"O" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"N" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"N" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"M" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"M" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"L" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"L" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"K" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"K" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"J" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"J" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"I" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"I" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"H" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"H" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"G" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"G" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"F" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"F" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"E" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"E" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"D" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"D" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"C" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"C" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"B" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"B" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
"A" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the substance of the invention		"A" document of particular relevance; the document is considered to be of particular relevance to the substance of the invention	
D. CERTIFICATION			
Date of the Search Report of the International Search		Date of Issuance of this International Search Report	
11 January 1991		11 FEB 1991	
International Searching Authority		International Searching Authority	
ISA/US		Edward J. Glick	

Form PCT/ISA/210 (Revised March 1989)

International Application No. PCT/US 90/06482

B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Character of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant passages **	Relevant to Claim No. **
Y	Proceedings of the 8th Iuice Congress of the International Measurement Confederation Conference: Measurement for Progress in Science and Technology, Ohsawa et al., "On the possibility of gas temperature using two-photon excitation", pp 523-528. See section 2, Two-Photon Absorption.	1,7
A	US, A. 4,405,237 (Manuccia et al.) 20 September 1983 (20.09.83). See full document.	1-18
A	US, A. 4,466,080 (Swinson et al.) 14 August 1984 (14.08.84). See full document.	1-18
A	US, A. 4,471,670 (Swinson et al.) 11 September 1984 (11.09.84). See full document.	1-18

Form PCT/ISA/210 (Revised March 1989)

第1頁の続き

⑫発 明 者

ストリックラー、ジェイムズ・
ビー

アメリカ合衆国14850ニューヨーク州イサカ、クラーク・ホール210
番

⑬発 明 者

ウェッブ、ウォット・ダブリュ
ー

アメリカ合衆国14850ニューヨーク州イサカ、ハイランド・ロード4
09番